

Determination of the germination temperature of *Moringa oleifera* seeds with support of vigor tests

Determinación de la temperatura de germinación de las semillas de *Moringa oleifera* con apoyo de las pruebas de vigor

Marlen Navarro¹, S. M. Cicero² and F. G. Gomes-Junior²

¹Estación Experimental de pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Universidad de Matanzas.

Central España Republicana. CP44280. Matanzas, Cuba.

²Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. Brasil

Email: boulandier@ihatuey.cu

Samples from six seeds lots of *Moringa oleifera* cv. Supergenius were used with the objective of determining the optimum temperature for the germination test of this species. The temperatures 25°C; 30°C and 20-30°C were evaluated. The used vigor tests were: germination test (G), germination rate index (GRI), electric conductivity test (EC) and the plantlet computerize analysis through the SVIS software and the indexes that are automatically generated. All variables were subjected to analysis of variance, differences were declared significant according to Tukey test ($P \leq 0.05$) with the help of the statistical package SPSS 22.0. The EC values showed better seed quality in the lots two and four. For G and FGC, the lot four showed the highest value for the evaluated temperatures. Although for FGC the lot four at 30°C did not differ from lots one, two and six. The best GRI performances were for the lots one, two, four, five and six at 30°C. For the indexes generated by the SVIS, the vigor index (VI) in lot four at 30°C was higher, as for the growth index (GI). The analysis of the uniformity index (UI) for temperatures showed differences for the lots two, four and five; always with the highest values for 30°C. For plantlets length (PL) lots one, five and six showed the best performance at 30°C without differ from 25°C. Neither differ lot one for 25 and 30°C. While lot four showed higher performance for PL at 30°C in relation to other temperatures. In a general way, the study results showed the best performance of moringa seeds at 30°C.

Key words: *moringa*, *germination*, *SVIS®*, *vigor*.

Introduction

Under controlled conditions, when humidity does not limit, the rate and germination percentage are controlled by temperature (Bewley and Black, 1984). For each species there is a temperature range within which the germination process can be completed in a reasonable time

The process of seeds germination involves a series of metabolic activities, during which a sequence of chemical reactions occur with own demands in terms of temperature (Marcos Filho, 2005). Similarly, the temperature is essential for germination, because it acts on the water absorption rate and in biochemical reactions that determine the whole process (Bewley and Black, 1984); in consequence, it affects the rate and the uniformity of the total germination (Carvalho and Nakagawa, 2012). Therefore, temperature is a factor of vital importance in the germination, emergence and

Se utilizaron muestras de seis lotes de semillas de *Moringa oleifera* cv. Supergenius con el objetivo de determinar la temperatura óptima para el test de germinación de esta especie. Se evaluaron las temperaturas: 25°C; 30°C y 20-30°C. Las pruebas de vigor empleadas fueron: test de germinación (G), índice de velocidad de germinación (IVG), test de conductividad eléctrica (CE) y análisis computadorizado de plántulas a través del software SVIS y los índices que se generan automáticamente. Todas las variables se sometieron a análisis de varianzas, las diferencias se declararon significativas según el test de Tukey ($P \leq 0.05$) con auxilio del paquete estadístico SPSS 22.0. Los valores de CE indicaron mejor calidad de las semillas en los lotes 2 y 4. Para G y PCG, el lote 4 exhibió el valor más alto para las temperaturas evaluadas, aunque para PCG el lote 4 a 30°C no difirió de los lotes 1, 2 y 6. Los mejores comportamientos de IVG fueron para los lotes 1, 2, 4, 5 y 6 a los 30 °C. Para los índices generados por el SVIS, el índice de vigor (IV) en el lote 4 a 30°C fue superior, al igual que para el índice de crecimiento (IC). El análisis del índice de uniformidad (IU) para las temperaturas mostró diferencias para los lotes 2, 4 y 5, siempre con los valores más altos para 30 °C. Para la longitud de las plántulas (LP), los lotes 1, 5 y 6 exhibieron el mejor desempeño en 30 °C, sin diferir de 25°C. Tampoco difirió el lote 1 para 25 y 30°C. Mientras que el lote 4 mostró desempeño superior para LP a 30 °C con relación a las demás temperaturas. De manera general, los resultados del estudio indicaron el mejor desempeño de las semillas de moringa a 30°C.

Palabras clave: *moringa*, *germinación*, *SVIS®*, *vigor*

Introducción

En condiciones controladas, cuando la humedad no es una limitante, tanto la tasa como el porcentaje de germinación se controlan por la temperatura (Bewley y Black 1984). Para cada especie, existe un intervalo de temperaturas en el que el proceso de germinación puede completarse en un tiempo razonable.

El proceso de germinación de las semillas envuelve actividades metabólicas durante las que ocurre una secuencia de reacciones químicas, con exigencias propias en cuanto a la temperatura (Marcos Filho 2005). Del mismo modo, la temperatura es fundamental para la germinación, pues actúa en la velocidad de absorción del agua y en las reacciones bioquímicas que determinan todo el proceso (Bewley y Black 1984). En consecuencia, afecta la velocidad y la uniformidad de la germinación total (Carvalho y Nakagawa, 2012). Por tanto, la temperatura es un factor de vital importancia

vigor expression.

For the analysis of moringa seeds, the germination test is not still standardized. There are few studies related with the optimal conditions of light, temperature and substrate for germination. From the growing interest in this species, the objective of this research was to determine the optimal germination temperature of *Moringa oleifera* seeds, with the purpose of contributing to the analysis of seeds of this species and the standardization of the germination test.

Materials and Methods

Seeds from six lots of *Moringa oleifera* cv. Supergenius were used and three options of temperature were evaluated: 25°C; 30°C and 20-30°C.

Germination test. Four repetitions of 25 seeds from each lot were used for each temperature. The test was performed in substrate of paper towel humidified with distilled water in the ratio 1:2.5 (paper: water). The rolls were kept in the germinator according to the evaluation temperature until 14 days after sowing.

Germination rate index. It was calculated during the germination test and the counts were performed daily at the same time, from the sowing. For the calculation the formula proposed by Maguire (1962) was used.

Electric conductivity test. Four repetitions of 25 seeds for each lot were used, which were weighed and placed in a container with 75mL of deionized water and kept in the germinator at 25 ± 1°C, for 24 h in dark (ISTA 2009). The electrical conductivity readings were performed in a DIGIMED equipment DM-31. The readings values were divided between the seeds weight and the results expressed in $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

SVIS®. The plantlets were obtained from 10 repetitions of 20 seeds for each lot in each temperature. The procedure was similar to that described for the germination test. The rolls were kept in three germinators regulated at 20-30°C, 25°C and 30°C during seven days in dark. The general procedures for working with the software were: (i) the scanner resolution was 100 dpi and (ii) the plantlets size was 4.0; 5.0 and 6.0 inches for 20-30°C; 25°C and 30°C; according to the results of preliminary tests.

Results and Discussion

The germination test is not sufficient to detect differences in the physiological potential of seeds, especially when these are exposed to different temperatures. Therefore the vigor tests are considered important tools in seed testing laboratories.

The conductivity values expressed in $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (table 1) showed better quality in lots two and four, while lots five and six were those of lower vigor.

The principle of the electric conductivity test states that the less vigorous seeds (more deteriorate) have lower rate of restoring the integrity of cell membranes during

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 49, Number 4, 2015
en la germinación, emergencia y expresión del vigor.

Para el análisis de las semillas de moringa, aún no está estandarizado el test de germinación. Existen escasos estudios relacionados con las condiciones óptimas de luz, temperatura y sustrato para la germinación. A partir del creciente interés por esta especie, este trabajo tuvo como objetivo determinar la temperatura óptima de germinación de las semillas de *Moringa oleifera*, con el propósito de contribuir al análisis de semillas de esta especie y la estandarización del test de germinación.

Materiales y Métodos

Se utilizaron semillas de seis lotes de *Moringa oleifera* vc. Supergenius y se evaluaron tres opciones de temperaturas: 25 °C; 30 °C y 20-30 °C.

Test de germinación. Se utilizaron cuatro repeticiones de 25 semillas de cada lote para cada temperatura. El test se realizó en sustrato de papel toalla humedecido con agua destilada en la proporción 1:2.5 (papel:agua). Los rollos se mantuvieron en el germinador, de acuerdo con la temperatura de evaluación, hasta los 14 d después de la siembra.

Índice de velocidad de germinación. Se calculó durante el test de germinación. Los conteos se realizaron diariamente a la misma hora, a partir de la siembra. Para el cálculo se utilizó la fórmula propuesta por Maguire (1962).

Test de conductividad eléctrica. Se utilizaron cuatro repeticiones de 25 semillas para cada lote. Se pesaron y se colocaron en un recipiente con 75 mL de agua desionizada y se mantuvieron en el germinador a 25 ± 1°C, durante 24 h en la oscuridad (ISTA 2009). Las lecturas de la conductividad eléctrica se realizaron en un equipo marca DIGIMED, modelo DM-31. Los valores de las lecturas se dividieron entre el peso de las semillas y los resultados expresados en $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

SVIS®. Las plántulas se obtuvieron de 10 repeticiones de 20 semillas para cada lote en cada temperatura. El procedimiento fue similar al descrito para el test de germinación. Los rollos se mantuvieron en tres germinadores regulados a 20-30°C, 25°C y 30°C, durante siete días en la oscuridad. Los procedimientos generales para el trabajo con el programa fueron: (i) la resolución del scanner fue 100 dpi y (ii), el tamaño máximo de las plántulas fue 4,0; 5,0 y 6,0 pulgadas para 20-30°C; 25°C y 30°C, de acuerdo con los resultados de los tests preliminares.

Resultados y Discusión

El test de germinación no es suficiente para detectar diferencias en el potencial fisiológico de las simientes, máxime cuando se exponen a diferentes temperaturas. Por ello, las pruebas de vigor se consideran importantes herramientas en los laboratorios de análisis de semillas.

Los valores de conductividad expresados en $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (tabla 1) indicaron mejor calidad en los lotes 2 y 4, mientras que los lotes 5 y 6 resultaron los de vigor más bajo.

Table 1. Performance of the variables of seeds vigor from six moringa lots evaluated at different temperatures.

Lot	EC	Germination			FGC	GRI		
		25°C	30°C	20-30°C		25°C	30°C	20-30°C
1	204.6 ^b	44.0 ^b	57.0 ^{bc}	40.0 ^{bc}	44.0 ^b	58.0 ^{bc}	33.0 ^{bc}	6.9 ^b
2	122.3 ^a	46.0 ^b	58.0 ^{bc}	53.0 ^c	45.0 ^b	58.0 ^{bc}	47.0 ^c	6.5 ^b
3	252.0 ^{cd}	7.0 ^a	17.0 ^a	12.0 ^a	7.0 ^a	14.0 ^a	11.0 ^a	1.0 ^a
4	172.8 ^{ab}	67.0 ^c	71.0 ^c	71.0 ^d	67.0 ^c	70.0 ^c	67.0 ^d	14.3 ^d
5	307.3 ^e	50.0 ^b	35.0 ^{ab}	34.0 ^b	49.0 ^b	35.0 ^{ab}	30.0 ^b	9.2 ^c
6	277.5 ^{de}	16.0 ^a	54.0 ^{bc}	45.0 ^{bc}	16.0 ^a	54.0 ^{bc}	43.0 ^{bc}	2.9 ^a
SE (\pm)	17.13	4.51	6.13	4.88	4.60	6.03	4.73	0.66
							1.70	0.67

abcd Means followed by the same letter do not differ to each other by Tukey test ($p \leq 0.05$)

Table 2. Values of the indexes generated by the el SVIS® for the six moringa lots evaluated at different temperatures

Lot	25°C	VI			GI	UI			PG
		30°C	20-30°C	25°C		30°C	20-30°C	25°C	
1	360.6 ^b	431.0 ^b	281.8 ^{bc}	268.8 ^b	362.8 ^b	179.6 ^{bc}	575.2 ^{bc}	591.8 ^{bc}	522.2 ^{ab}
2	507.2 ^c	518.2 ^b	367.6 ^c	445.4 ^c	436.2 ^b	270.8 ^c	652.6 ^{bc}	710.0 ^{cd}	595.2 ^b
3	116.2 ^a	186.8 ^a	179.0 ^{ab}	43.0 ^a	102.0 ^a	83.2 ^{ab}	288.4 ^a	385.8 ^a	403.6 ^a
4	719.2 ^d	901.2 ^c	338.0 ^c	713.2 ^d	960.4 ^c	229.8 ^c	733.8 ^c	784.4 ^d	592.2 ^b
5	384.8 ^b	428.8 ^b	164.6 ^a	313.8 ^b	356.4 ^b	29.2 ^a	551.6 ^b	599.0 ^{bc}	482.6 ^{ab}
6	230.6 ^a	225.4 ^a	179.0 ^{ab}	110.2 ^a	106.2 ^a	38.4 ^a	512.6 ^b	505.0 ^{ab}	508.4 ^{ab}
SE (\pm)	40.31	61.66	34.04	44.58	76.17	36.78	53.45	45.69	46.88
								0.551	0.962

abcd Means followed by the same letter do not differ to each other by Tukey test ($p \leq 0.05$)

the imbibitions and therefore release higher amounts of solutes for the external environment (Hepburn *et al.*, 1984).

For germination, the lot four showed the highest value for the evaluated temperatures (table 1). This performance was associated to the results obtained in the electric conductivity test and shows that vigor is directly related to the cell membranes integrity (Marcos Filho, 2005). For 30°C, the lot four did not statistically differ from lots one, two and six. The worst performance of germination was for lot three.

According to the data of table 1, the germination process was markedly affected in lot six when seeds germinated at 25°C. This could be associated to high values of electric conductivity that were recorded in this lot. According to Carvalho and Nakagawa (2012), in the low vigor seeds are high disorganization in the cell membranes structure and thus prevent the reconstitution of metabolic functions for the start and completion of germination stage.

For the first germination count (table 1) the lot four showed the highest values for the temperatures 20°C, 30°C and 20-30°C. It is important to highlight that for 30°C lot four did not differ from lots one, two and six. Similar performance was verified for the germination test. The analysis of temperature for lots showed the highest value at 30°C in lots one, two and six while the FGC value in lot five was similar for 25°C and 30°C, also 30°C did not show differences at 20-30°C.

Lot four showed the highest values for the germination rate index (table 1), although the same lot did not differ from lot two at 30°C. For lots according to the evaluated temperatures, the best performances were for lots one, two, four, five and six at 30°C. The germination rate in lot three was the lowest in the three evaluated temperatures, which is attributed to the low vigor shown by the seeds through the electric conductivity readings. As shown in table 1, the GRI was significantly higher at 30°C in relation to the other temperatures.

The results for the tests related with the germination process (G, FGC and GRI) showed the superiority of lot four in the evaluated temperatures. According to Marcos Filho (2005) the optimal temperature should allow maximum germination in the lower time possible. In general way the analysis of lots per temperatures showed the best performance of moringa seeds at 30°C. According to Carvalho and Nakagawa (2012) the optimal temperature allows the most efficient combination of percentage and germination rate.

The integration of automated systems with the vigor tests considered traditional in the evaluation of seeds quality may contribute to the development of methodologies that allow the standardization of vigor tests (Marcos Filho, 2010).

The results of the evaluation of physiological

El principio del test de conductividad eléctrica establece que las semillas menos vigorosas (más deterioradas) presentan menor velocidad de restablecimiento de la integridad de las membranas celulares durante la imbibición y, en consecuencia, liberan mayores cantidades de solutos para el medio exterior (Hepburn *et al.* 1984).

Para la germinación, el lote 4 exhibió el valor más alto para las temperaturas evaluadas (tabla 1). Este comportamiento estuvo asociado a los resultados obtenidos en el test de conductividad eléctrica y demuestra que el vigor está directamente relacionado con la integridad de las membranas celulares (Marcos Filho 2005). Para 30 °C, el lote 4 no difirió estadísticamente de los lotes 1, 2 y 6. El peor comportamiento de la germinación fue para el lote 3.

De acuerdo con los datos de la tabla 1, el proceso germinativo se afectó notablemente en el lote 6, cuando las semillas germinaron a 25°C. Esto pudo estar asociado a que en este lote se registraron altos valores de conductividad eléctrica. De acuerdo con Carvalho y Nakagawa (2012), en las semillas de bajo vigor existe mayor desorganización en la estructura de membranas celulares. Ello impide la reconstitución de las funciones metabólicas para el inicio y completamiento de la fase germinativa.

Para el primer conteo de germinación (tabla 1), el lote 4 mostró los valores más altos para las temperaturas 20°C, 30°C y 20-30°C. Es meritorio destacar que para 30°C, el lote 4 no difirió de los lotes 1, 2 y 6. Un comportamiento semejante se verificó para el test de germinación. El análisis de las temperaturas para los lotes manifestó el valor más alto para 30°C en los lotes 1, 2 y 6, mientras el valor de PCG en el lote 5 fue semejante para 25°C y 30°C además 30°C no mostró diferencias de 20-30°C.

El lote 4 mostró los valores más altos para el índice de velocidad de germinación (tabla 1), aunque el mismo lote no difirió del lote 2 a los 30 °C. Para los lotes en función de las temperaturas evaluadas, los mejores comportamientos fueron para los lotes 1, 2, 4, 5 y 6 a los 30 °C. La velocidad de germinación en el lote 3 fue la más baja en las tres temperaturas evaluadas, lo cual se le atribuye al bajo vigor mostrado por las semillas a través de las lecturas de conductividad eléctrica. Como muestra la tabla 1, el IVG fue notablemente superior a 30 °C en relación con las demás temperaturas.

Los resultados para los tests relacionados con el proceso germinativo (G, PCG e IVG) mostraron la superioridad del lote 4 en las temperaturas evaluadas. Según Marcos Filho (2005), la temperatura óptima debe permitir el máximo de germinación en la menor cantidad de tiempo posible. De manera general, el análisis de los lotes por las temperaturas indicó el mejor desempeño de las semillas de moringa a 30 °C. De acuerdo con Carvalho y Nakagawa (2012), la temperatura óptima permite la combinación más eficiente del porcentaje y la velocidad de germinación.

La integración de los sistemas automatizados con las pruebas de vigor consideradas tradicionales

potential of moringa seeds are showed on table 2, evaluated in different germination temperatures through computer analysis of plantlets with seven days of age, analyzed by the SVIS® software.

For vigor index (VI), it was verified that the lot four was higher for 25°C and 30°C, while at 20-30°C lot four did not show differences with lots one and two. In lot four, the VI value for 30°C was higher in high degree relative to 25°C and 20-30°C. While lot five was statistically similar at 25°C and 30°C, and higher for 20-30°C.

For the plantlets length index (GI), the results for 25 and 30°C showed better performance of lot four. For 30°C, the highest GI values were for lots one, two and four. Lot two was highlighted, although without significant differences with lots one and four. Among the evaluated temperatures, the Tukey test reported differences in lots four and five. For lot four, the highest value was at 30°C. Otherwise ,the GI of lot five for 25 and 30°C was statistically similar and differed from the performance for 20-30°C. The same performance for the vigor index (VI) was identified.

The uniformity index (UI) identified the best performance for 25°C (without statistical differences) of lots one, two and four. For 30°C were the lots two and four, and for 20-30°C were the lots one, two, four, five and six. The analysis for temperatures showed differences for lots two, four and five. Always with the highest values for 30°C, althought lots two and five did not differ for 25 and 30°C.

For the individual plantlets length (PL) at 25°C and 30°C temperatures, the highest values were for lot four. While for 20-30°C, there were not significant differences for lots one, two, four and five. In the temperatures analysis, lots one, five and six showed the best performance at 30°C, without differing from 25°C.Nor it differed lot one for 25 and 30°C.Lot four showed higher performance in plantlets length at 30°C, in relation to the other temperatures.

The use of SVIS® allowed to evaluate the seeds vigor and to determine the contribution of plantlets performance in the different evaluated temperatures. Marcos Filho (2010) stated that as added value the SVIS® make possible to reduce subjectivity, human interference and the necessary period for conduced the vigor tests.

For the parameters related with vigor and those generated by the SVIS®, the results showed higher performance for 30°C, intermediate performance for 25°C and the worst performance for 20-30°C. So it is recommended to use 30°C as optimal temperature for the assembly of the germination standard test of moringa seeds.

en la evaluación de la calidad de las semillas puede contribuir al desarrollo de metodologías que permiten la estandarización de los test de vigor (Marcos Filho 2010).

En la tabla 2 se muestran los resultados de la evaluación del potencial fisiológico de las semillas de moringa, evaluadas en diferentes temperaturas de germinación mediante el análisis computadorizado de plántulas con siete días de edad, analizadas por medio del programa SVIS®.

Para el índice de vigor (IV), se verificó que el lote 4 fue superior para 25°C y 30°C, en tanto en 20-30°C el lote 4 no mostró diferencias con los lotes 1 y 2. En el lote 4, el valor del IV para 30°C fue superior en alto grado en relación con 25°C y 20-30°C. Mientras que el lote 5 fue semejante estadísticamente en 25°C y 30°C, y superior para 20-30°C.

Para el índice de longitud de las plántulas (IC), los resultados revelaron para 25 y 30 °C mejor desempeño del lote 4. Para 30°C, los valores de IC más altos fueron para los lotes 1, 2 y 4. Se destacó el lote 2, aunque sin diferencias significativas con los lotes 1 y 4. Entre las temperaturas evaluadas, el test de Tukey informó diferencias en los lotes 4 y 5. Para el lote 4, el valor más alto fue 30 °C. Por otra parte, el IC del lote 5 para 25 y 30°C fue semejante estadísticamente y difirió del comportamiento para 20-30°C. Se identificó el mismo comportamiento para el índice de vigor (IV).

El índice de uniformidad (IU) identificó para 25°C el mejor desempeño (sin diferencias estadísticas) de los lotes 1, 2 y 4. Para 30 °C fueron los lotes 2 y 4, y para 20-30°C los lotes 1, 2, 4, 5 y 6. El análisis para las temperaturas mostró diferencias para los lotes 2, 4 y 5. Siempre con los valores más altos para 30°C, aunque los lotes 2 y 5 no difirieron para 25 y 30 °C.

Para la longitud individual de plántulas (LP) en las temperaturas de 25 °C y 30 °C, los valores más altos fueron para el lote 4. En tanto para 20-30°C, no hubo diferencias significativas para los lotes 1, 2, 4 y 5. En el análisis de las temperaturas, los lotes 1, 5 y 6 exhibieron el mejor desempeño en 30°C, sin diferir de 25°C. Tampoco difirió el lote 1 para 25 y 30°C. El lote 4 mostró desempeño superior en la longitud de plántulas en 30°C, con relación a las demás temperaturas.

La utilización del SVIS® permitió evaluar el vigor de las semillas y determinar la contribución del desempeño de las plántulas en las diferentes temperaturas evaluadas. Marcos Filho (2010) planteó que como valor agregado el SVIS® posibilita reducir la subjetividad, la interferencia humana y el período necesario para la conducción de los ensayos de vigor.

Para los parámetros relacionados con el vigor y los generados por el SVIS®, los resultados indicaron desempeño superior para 30°C, comportamiento intermedio para 25 °C y peor desempeño para 20-30°C. Se recomienda emplear 30 °C como temperatura óptima para el montaje de la prueba estándar de germinación de las semillas de moringa.

References

- Bewley, D.D. & Black, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum. 467 pp.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J. 2012. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP. 5ta Ed. 590p.
- ISTA. 2009. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology. 333 pp.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in relation evaluation for seedling emergence vigor. Crop Science 2:176
- Marcos Filho, J. 2005. Fisiologia de sementes das plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ. 495 pp.
- Marcos-Filho, J. 2010. Sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas (SVIS®) para avaliação do vigor de sementes. Informativo ABRATES. 20:40

Received: July 5, 2015